

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**RENATA COSTA DO NASCIMENTO**

IDENTIFICAÇÃO DE FIPRONIL EM MATRIZES DE INTERESSE FORENSE

Rio de Janeiro

2014

Renata Costa do Nascimento

## IDENTIFICAÇÃO DE FIPRONIL EM MATRIZES DE INTERESSE FORENSE

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Instituto de Química da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como parte dos requisitos necessários  
para à obtenção do grau de bacharel  
em Química com Atribuição  
Tecnológica.

Orientador: Carlos Alberto da Silva Riehl

Rio de Janeiro

2014

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que mesmo de longe, sempre proporcionou o apoio necessário para eu alcançar meus objetivos. Em especial, aos meus tios Lourdes e Dionízio, que cuidaram de mim durante os cinco anos em que estive na universidade. Aos meus pais, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, aguentando a saudade para que eu cumprisse a minha meta e seguisse meu próprio caminho profissional. Aos meus irmãos, tios e tias, primos e primas.

Aos meus amigos e companheiros de classe, Vinicius, Bruno, Mônica, Lincoln, Alex, Estefano, Fernanda, Jonas, Marllon e Pedro, que não foram apenas amigos, como também tutores e psicólogos e com quem dividi as maiores alegrias e tristezas durante esse período. Aos meus amigos do estágio, Alline, Fabrício, Adriana e Danielly, que sempre solícitos, me auxiliaram e ensinaram como podiam. E aos meus amigos Laís, Verônica, Lívia e Francisco, por me ouvirem desabafar e me ajudarem nos momentos mais difíceis. Obrigada a todos.

Aos meus amigos de laboratório, Ana Carolina, Adriana, Priscila, Rayra, Fernanda e Alexandre. Obrigada pelos ensinamentos, companheirismo, críticas e risadas.

À BASF, especialmente a química Bianca Jones, que forneceu a substância padrão e o produto comercial.

E obrigado principalmente ao meu orientador, que foi minha fonte de aprendizado Prof. Carlos Riehl, que acreditou em mim, exigiu mais do que eu me achava capaz de realizar. Obrigada pela paciência e pelo apoio durante todo esse trabalho. Serei eternamente grata.

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE FIPRONIL EM MATRIZES DE INTERESSE FORENSE

ALUNO: Renata Costa do Nascimento

ORIENTADOR: Carlos Alberto da Silva Riehl – DQA – Instituto de Química – UFRJ

O fipronil é um inseticida largamente utilizado no controle de diversas pragas e de fácil obtenção no mercado, sendo considerado moderadamente tóxico, com uma  $DL_{50} = 97$  mg/kg por via oral, em ratos. Centenas de casos de intoxicação humana são registrados anualmente no Brasil, tendo essa substância como uma possível causadora, seja por ingestão acidental ou intencional, sendo, portanto, de interesse forense. Neste trabalho se implantou uma metodologia para o isolamento e a identificação do fipronil na matriz leite. Para tal, desenvolveu-se primeiro uma metodologia para o isolamento deste de um produto comercial, obtendo-o em purezas de até 99%. Com essa informação e dos limites de detecção do fipronil em Cromatografia em Camada Fina (CCF) de 2 g/L, e Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-E) de 10 mg/L, além do limite de quantificação do fipronil em CG-EM de 10 mg/L, construiu-se uma curva analítica que permitiu que se relacionasse a área do pico proveniente do fipronil a uma concentração predita. Portanto, pode-se avaliar o grau de recuperação deste em cada extrato do leite fortificado, nos quais o fipronil foi identificado. O método, porém, apresentou baixa repetibilidade, com graus de recuperação menores que 32%

Palavras-chave: CG-EM, fipronil, leite, formicida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.2	ANÁLISE POR CCF.....	Erro! Indicador não definido.
3.3	ANÁLISE POR CG-EM .....	Erro! Indicador não definido.
3.4	EXTRAÇÃO DO FIPRONIL DE UM FORMICIDA COMERCIAL.....	Erro! Indicador não definido.
3.5	PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE FORMICIDA COMERCIAL.....	Erro! Indicador não definido.
3.6	DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
3.7	CURVA ANALÍTICA NO CG-EM .....	Erro! Indicador não definido.
3.8	FORTIFICAÇÃO DO LEITE .....	Erro! Indicador não definido.
3.9	EXTRAÇÃO DO FIPRONIL DO LEITE .....	Erro! Indicador não definido.
3.11	PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DO LEITE ...	Erro! Indicador não definido.
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**RENATA COSTA DO NASCIMENTO**

IDENTIFICAÇÃO DE FIPRONIL EM MATRIZES DE INTERESSE FORENSE

Rio de Janeiro

2014

Renata Costa do Nascimento

## IDENTIFICAÇÃO DE FIPRONIL EM MATRIZES DE INTERESSE FORENSE

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Instituto de Química da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como parte dos requisitos necessários  
para à obtenção do grau de bacharel  
em Química com Atribuição  
Tecnológica.

Orientador: Carlos Alberto da Silva Riehl

Rio de Janeiro

2014

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que mesmo de longe, sempre proporcionou o apoio necessário para eu alcançar meus objetivos. Em especial, aos meus tios Lourdes e Dionízio, que cuidaram de mim durante os cinco anos em que estive na universidade. Aos meus pais, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, aguentando a saudade para que eu cumprisse a minha meta e seguisse meu próprio caminho profissional. Aos meus irmãos, tios e tias, primos e primas.

Aos meus amigos e companheiros de classe, Vinicius, Bruno, Mônica, Lincoln, Alex, Estefano, Fernanda, Jonas, Marllon e Pedro, que não foram apenas amigos, como também tutores e psicólogos e com quem dividi as maiores alegrias e tristezas durante esse período. Aos meus amigos do estágio, Alline, Fabrício, Adriana e Danielly, que sempre solícitos, me auxiliaram e ensinaram como podiam. E aos meus amigos Laís, Verônica, Lívia e Francisco, por me ouvirem desabafar e me ajudarem nos momentos mais difíceis. Obrigada a todos.

Aos meus amigos de laboratório, Ana Carolina, Adriana, Priscila, Rayra, Fernanda e Alexandre. Obrigada pelos ensinamentos, companheirismo, críticas e risadas.

À BASF, especialmente a química Bianca Jones, que forneceu a substância padrão e o produto comercial.

E obrigado principalmente ao meu orientador, que foi minha fonte de aprendizado Prof. Carlos Riehl, que acreditou em mim, exigiu mais do que eu me achava capaz de realizar. Obrigada pela paciência e pelo apoio durante todo esse trabalho. Serei eternamente grata.



## RESUMO

### PROJETO DE CURSO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE FIPRONIL EM MATRIZES DE INTERESSE FORENSE

ALUNO: Renata Costa do Nascimento

ORIENTADOR: Carlos Alberto da Silva Riehl – DQA – Instituto de Química – UFRJ

O fipronil é um inseticida largamente utilizado no controle de diversas pragas e de fácil obtenção no mercado, sendo considerado moderadamente tóxico, com uma  $DL_{50} = 97$  mg/kg por via oral, em ratos. Centenas de casos de intoxicação humana são registrados anualmente no Brasil, tendo essa substância como uma possível causadora, seja por ingestão acidental ou intencional, sendo, portanto, de interesse forense. Neste trabalho se implantou uma metodologia para o isolamento e a identificação do fipronil na matriz leite. Para tal, desenvolveu-se primeiro uma metodologia para o isolamento deste de um produto comercial, obtendo-o em purezas de até 99%. Com essa informação e dos limites de detecção do fipronil em Cromatografia em Camada Fina (CCF) de 2 g/L, e Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-E) de 10 mg/L, além do limite de quantificação do fipronil em CG-EM de 10 mg/L, construiu-se uma curva analítica que permitiu que se relacionasse a área do pico proveniente do fipronil a uma concentração predita. Portanto, pode-se avaliar o grau de recuperação deste em cada extrato do leite fortificado, nos quais o fipronil foi identificado. O método, porém, apresentou baixa repetibilidade, com graus de recuperação menores que 32%

Palavras-chave: CG-EM, fipronil, leite, formicida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.2	ANÁLISE POR CCF.....	Erro! Indicador não definido.
3.3	ANÁLISE POR CG-EM .....	Erro! Indicador não definido.
3.4	EXTRAÇÃO DO FIPRONIL DE UM FORMICIDA COMERCIAL.....	Erro! Indicador não definido.
3.5	PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE FORMICIDA COMERCIAL.....	Erro! Indicador não definido.
3.6	DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
3.7	CURVA ANALÍTICA NO CG-EM .....	Erro! Indicador não definido.
3.8	FORTIFICAÇÃO DO LEITE .....	Erro! Indicador não definido.
3.9	EXTRAÇÃO DO FIPRONIL DO LEITE .....	Erro! Indicador não definido.
3.11	PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DO LEITE ...	Erro! Indicador não definido.
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## 1 INTRODUÇÃO:

A Química Forense é uma subdivisão da grande área do conhecimento que é a Ciência Forense, que também pode ser denominada Criminalística. Ela aplica os princípios da ciência natural a matérias de debate legal. Assim, podemos dizer que a Química Forense é a aplicação da química na investigação de crimes. Estes, entretanto, não são limitados a ações contra indivíduos, tais como homicídios, furtos, fraudes e incêndios criminosos. A Química Forense também está envolvida na investigação de crimes contra a sociedade, tais como adulteração de alimentos e medicamentos, poluição ambiental, uso e distribuição de produtos químicos perigosos e condições perigosas de trabalho [1]. O trabalho do laboratório forense pode ser dividido nas seguintes etapas:

- 1) identificação de materiais ou substâncias encontradas como evidência de crime;
- 2) comparação de substâncias ou materiais na tentativa de se estabelecer uma origem comum;
- 3) reconstituição da cena em que se passou o evento, através da análise física da evidência.

No Brasil vários casos de envenenamento são registrados mensalmente nas Delegacias Policiais. Os materiais suspeitos de serem os agentes causadores do fato criminoso são encaminhados aos Institutos de Criminalística, para que sejam feitos exames químicos com a finalidade de se estabelecer a presença ou não do agente causador do delito.

O número de casos de homicídios resolvidos através da investigação policial no Brasil é muito pequeno se comparado com os países desenvolvidos (menos de 10% no Brasil e mais e 90% nos EUA) [2], sendo a Perícia Criminal peça importantíssima no processo de investigação, pois fornece o apoio científico à mesma.

As substâncias mais comumente usadas em casos de envenenamentos são aquelas de mais fácil acesso, as quais se pode comprar em farmácias, lojas de jardinagem, loja de produtos agrícolas, supermercados etc.

O uso de pesticidas na agricultura tem como objetivo principal o controle de pragas prejudiciais às plantações e um consequente aumento da produção. Pesticidas são substâncias

ou misturas de substâncias utilizadas para repelir ou destruir as pragas alvo, que podem ser insetos, ácaros, fungos, bactérias, roedores etc [3].

Os pesticidas são tóxicos a diversos tipos de animais como insetos, moluscos, peixes, aves e mamíferos, podendo apresentar efeitos adversos em animais não-alvo, como abelhas, o que gera prejuízo e preocupação devido a uma possível influência no equilíbrio de ecossistemas, tanto às pragas, quanto aos seus predadores [4].

Em 2011, foram registrados 105.875 casos de intoxicação humana no Brasil, sendo 5.075 desses devido a agrotóxicos de uso agrícola e 2.485 de uso doméstico. O número de óbitos entre esses casos foi de 304, sendo a intoxicação por uso de agrotóxicos agrícolas o maior agente causador, com 129 óbitos. Dos 133 casos óbitos por intoxicação por agrotóxicos, 121 foram registrados como homicídios ou suicídios [5].

O fipronil (Figura 1a), 5-amino-[(2,6-dicloro)-4-trifluormetil-fenil]-4-trifluormetil-sulfinil-1H-pirazol-3-carbonitrila, é um inseticida da classe do fenilpirazol (Figura 1b), largamente utilizado no controle de pragas como besouros, formigas, gafanhotos, cupins, pulgas de animais domésticos etc [6].

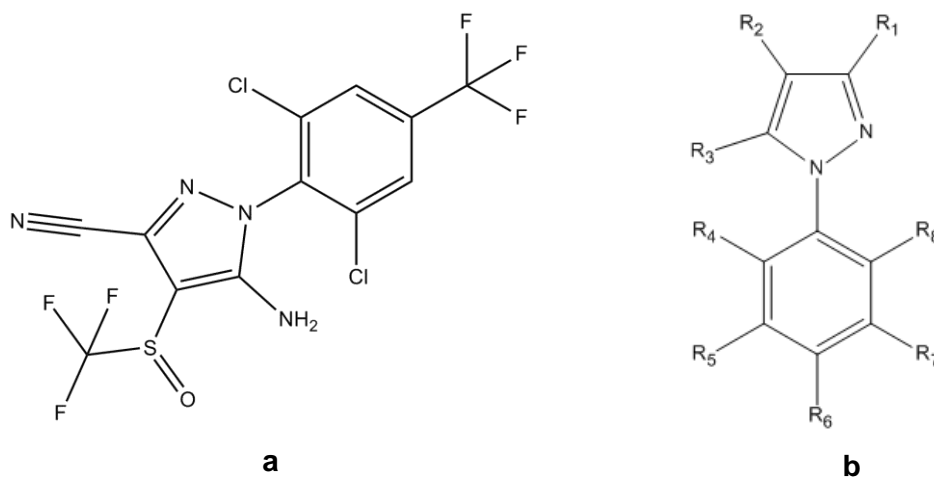


Figura 1: (a) Estrutura molecular do fipronil e (b) estrutura molecular genérica da classe fenilpirazol

O fipronil é um inseticida descoberto e desenvolvido pela empresa francesa Rhone-Poulenc Agro entre os anos de 1985 e 1987. Foi apresentado na *Brighton Conference* apenas em 1992 e colocado no mercado no ano seguinte. Entre 1987 e 1996, diversos estudos foram feitos sobre os efeitos do fipronil em mais de 250 insetos-alvo presentes em 60 colheitas pelo mundo. Em 1997, a produção dessa substância era de aproximadamente 480 toneladas por ano, sendo 39% dessa quantidade voltada para a proteção de colheitas. Já em 1999, um

produto comercial baseado no fipronil se tornou o mais importado na área de inseticidas aplicados na produção de arroz, tratando por volta de 400 mil hectares dessas plantações pelo mundo. Nesse mesmo ano, a Rhone-Poulenc se fundiu a empresa AgrEvo, formando a empresa agrícola Aventis CropScience, posteriormente comprada pela Bayer. Em 2002, a empresa BASF comprou os direitos sobre a patente (EP0295117B1) para produção e venda dos produtos do fipronil e outros fungicidas, os detendo até hoje em diversos países, porém, sem exclusividade no Brasil. Dois anos depois, o uso do fipronil como um produto fitossanitário foi proibido na França, devido a sua possível influência na mortalidade de abelhas. Apesar disso, ainda é um dos mais usados inseticidas veterinários [6,7].

À temperatura ambiente, o fipronil é um sólido branco pouco solúvel em água (0,0019 g/L (pH 5) e 0,0024 g/L (pH 9) à 20°C), apresentando de alta a moderada solubilidade em solventes orgânicos tais como acetona, metanol, etanol, acetato de etila, diclorometano, hexano e acetonitrila [8].

O fipronil age como um potente bloqueador dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), responsáveis pela abertura de canais de cloro integrados a esses receptores, que permitem a entrada desse íon no meio intracelular do tecido cerebral. A ruptura dos receptores GABA impede a entrada de íons cloreto, causando uma despolarização entre o meio intracelular e extracelular e um excesso de estimulação neural. Essa despolarização ativa certas enzimas de degradação dependentes da concentração desses íons o que leva à morte celular neuronal e consequente morte do inseto alvo. O fipronil e seus produtos de degradação (Figura 2 pág. 9) apresentam diferentes afinidades com as subunidades dos receptores GABA de insetos e mamíferos. Em ratos, o fipronil em altas doses causa um aumento no excitamento neuronal, porém, esse efeito é temporário. Essa substância apresenta uma maior afinidade com complexos receptores de insetos, quando comparados aos de mamíferos, o que aumenta a seletividade pelos seus alvos, deixando uma margem de segurança maior para humanos e outros animais. Estudos indicam que o fipronil causa efeitos de inibição da testosterona e na tireóide, porém ainda é necessária confirmação destes [8,9,10].

O fipronil é considerado moderadamente tóxico por via oral pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*U.S. Environmental Protection Agency – EPA*) com uma  $DL_{50}$  em ratos de 97 mg/kg, sendo a menor dose que produziu efeitos adversos de 7,5 mg/kg. Este também é de pouco a moderadamente tóxico por via dérmica e inalação. Os sintomas descritos de seus efeitos tóxicos em humanos são náusea, sudorese, vômito, dor de cabeça, dor abdominal, tontura, agitação, fraqueza e convulsões [8].

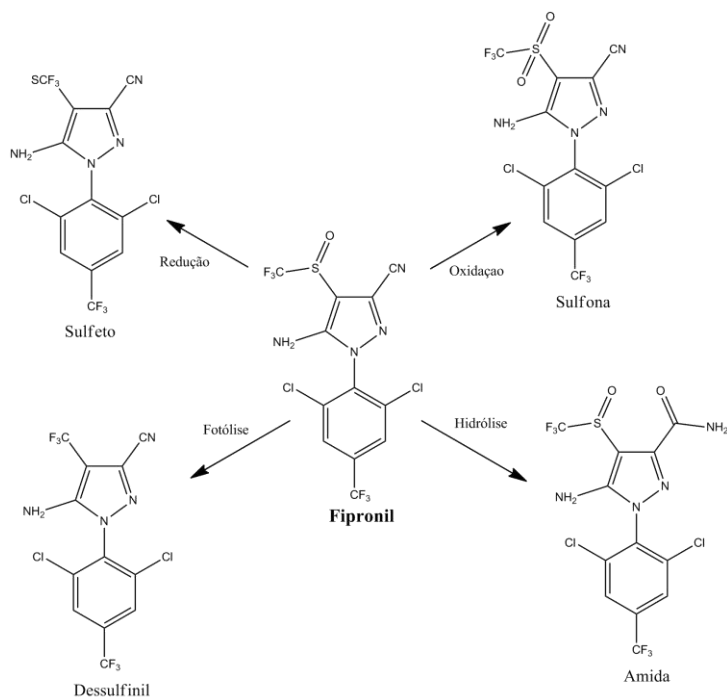


Figura 2: Os quatro principais produtos de degradação do fipronil. (Fonte: Adaptado de Le Faouder et al.)

Existem ainda poucos métodos para análise de fipronil. Na literatura há métodos de análise dessa substância em diferentes matrizes, como plasma de rato, plasma ovino, pólen, mel, cana-de-açúcar, açúcar, leite, silagem, solo, água etc, utilizando-se de diversas técnicas analíticas tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa acopladas à detectores de Ultravioleta, Espectrometria de Massa (EM), EM sequencial, de Captura de Elétrons etc [4, 9-14].

## 2 OBJETIVO:

O objetivo deste projeto é desenvolver uma metodologia analítica para o isolamento e a identificação do fipronil em matrizes de interesse forense, partindo de simulações de contaminação, visando que esta seja utilizável pelos Institutos de Criminalística do Brasil.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS:

#### 3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS:

Utilizou-se um padrão do fipronil com um percentual de pureza no rótulo de 99,3%. O formicida comercial utilizado no trabalho contém 2% m/m do princípio ativo estudado nesse trabalho e pode ser encontrado em lojas de produtos agrícolas.

Foram utilizados os seguintes solventes de grau P.A: acetato de etila (Quimex), acetona (Vetec), diclorometano (Quimex), hexano (Quimex) e metanol (Quimex).

As análises por CCF foram feitas em placas de vidro de 7,5 de altura e 2,5 cm de largura, recobertas com sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck).

As diluições partindo da solução padrão estoque foram realizadas com um pipetador automático *multiplate plus Eppendorf* com ponteiros de 2,5 e 5,0 mL e seringas de 10,00 e 250,00 µL (Hamilton Co.).

As evaporações dos solventes foram feitas em um rotaevaporador (Fisatom 802), com um banho de aquecimento externo (Fisatom 550).

Para as etapas de purificação dos extratos do formicida comercial se utilizou: sílica gel G 28-200 mesh (Merck) e uma coluna de vidro de 1,8 cm de diâmetro e 21,0 cm de altura. Para a etapa analógica da extração do fipronil em leite se utilizou: florisil 60-100 mesh (Merck) e uma coluna de vidro de 1,0 cm de diâmetro e 18,0 cm de altura.

As análises por CG-EM foram realizadas em um Cromatógrafo Varian 3800 acoplado à um Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo EM-EM Varian 1200L. Utilizou-se uma coluna Varian VF-5ms (5% fenil e 95% polisiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme.

As análises por CG-EM também foram feitas em um equipamento CG-2010 Shimadzu acoplado à um Espectrômetro de Massas CGMS-QP 2010 Plus Shimadzu. Utilizou-se uma coluna DB-5 (5% fenil e 95% polisiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme.

#### 3.2 ANÁLISE POR CCF:

Suspendeu-se aproximadamente 10 g de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> em água destilada, espalhando uniformemente por vinte placas de vidro de 7,5x2,5 cm. Deixou-se as placas

secarem por 12h ao ar e em seguida se ativou a sílica aquecendo-as a 100 °C por 30 minutos em uma estufa.

Preparou-se uma solução padrão, pesando-se 5,6 mg de fipronil e solubilizando em 1 mL de acetato de etila, obtendo-se uma solução a 5,6 g/L. Utilizando-se esta, testou-se diferentes solventes e misturas de solventes a fim de se escolher o eluente ideal para a técnica de CCF. Testou-se sete fases móveis diferentes, sendo essas: acetato de etila, hexano, mistura de hexano e acetato de etila nas proporções 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1 e a mistura de clorofórmio e metanol 1:1.

Para isso, aplicou-se a solução padrão na placa cromatográfica em tamanhos similares com microcapilares permitindo uma melhor comparação. Colocou-se aproximadamente 5 mL de cada solvente ou mistura de solventes em um béquer, contendo uma tira de papel de filtro, tampado por um vidro de relógio para garantir a saturação do ar na cuba cromatográfica. As bandas das substâncias foram reveladas em lâmpada de ultravioleta, com  $\lambda = 254$  nm, permitindo a comparação destas e a escolha do melhor eluente para a determinação da presença de fipronil.

Utilizou-se o índice de retenção ( $R_f$ ) como medida de comparação das manchas observadas nas análises por CCF. Esse valor pode ser calculado pela seguinte equação:

$$R_f = \frac{d^c}{d^s}$$

Sendo  $d^c$  a distância percorrida pelos componentes da mistura e  $d^s$  a distância percorrida pelo eluente.

### 3.3 ANÁLISE POR CG-EM:

As condições das análises por CG-EM foram adaptadas do trabalho de Le Faouder *et al* [11]. A energia do feixe de elétrons foi de 70 eV, a temperatura da linha de transferência de 250 °C e do injetor de 180 °C, em modo de injeção com divisão de fluxo em razão 1:20. Durante a programação de temperatura, aumentou-se a temperatura do forno de 75 °C (3min) até 210 °C (0 min), a uma taxa de 20 °C/min, em seguida até 225 °C (0 min) a 5 °C/min e finalmente até 320 °C (7 min) a uma taxa de 20 °C/min.



### 3.4 EXTRAÇÃO DO FIPRONIL DE UM FORMICIDA COMERCIAL:

Desenvolveu-se uma metodologia de extração, com o objetivo de isolar o fipronil a partir de um produto comercial contendo 2% dessa substância. Para isso, primeiramente se testou quatro solventes para determinação do mais adequado e mais eficiente. Os solventes testados foram: acetona, diclorometano, hexano e acetato de etila. Esses foram escolhidos, sabe

Aproximadamente 2g de formicida, previamente triturados foram transferidos para um béquer, no qual foram adicionados 20,0 mL do solvente. A extração foi realizada sob agitação magnética, por 30 minutos, e em seguida se filtrou para um balão de fundo redondo de massa conhecida, obtendo-se assim o extrato líquido. Repetiu-se esse procedimento mais um vezes, com a mesma amostra e mesmo volume do solvente, para melhor rendimento da extração. A combinação de ambos extratos foi, então, rotaevaporada, resultando no extrato sólido proveniente do formicida em cada solvente. Com o extrato seco, pesou-se os balões, possibilitando a medição da massa obtida em cada extração. Esta metodologia está demonstrada na Figura 3.

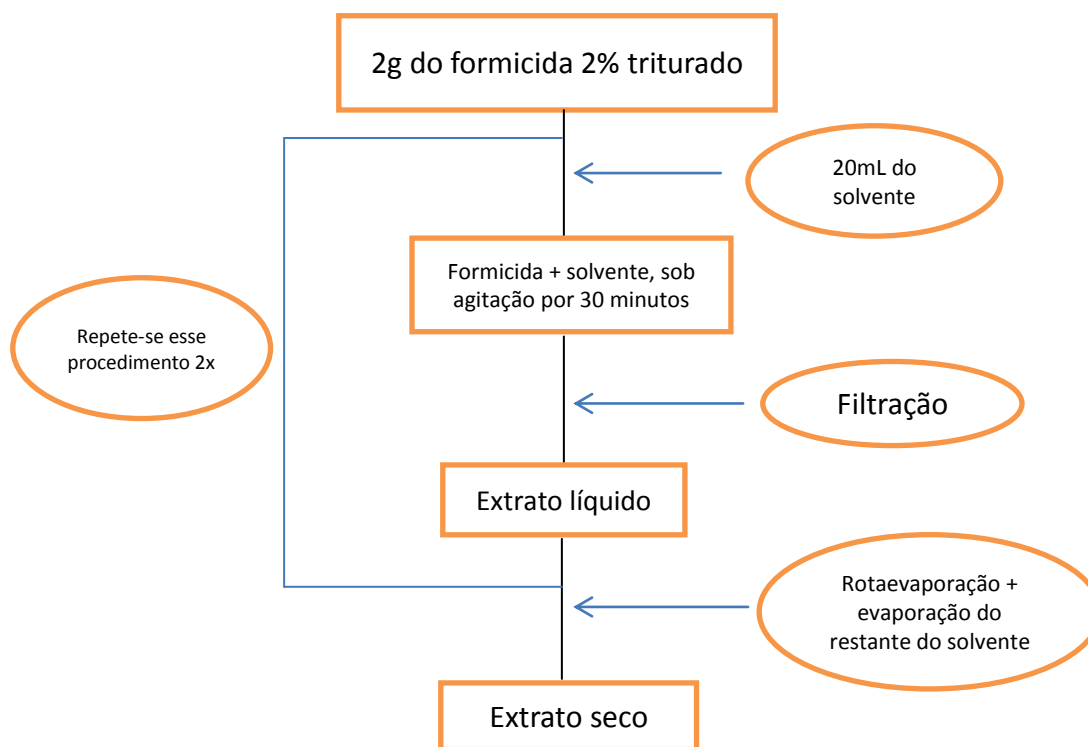


Figura 3: Representação esquemática da metodologia desenvolvida para extração do fipronil a partir de um formicida comercial.

Analizou-se estes extratos por CCF e CG-EM, comparando o índice de retenção ( $R_f$ ) e o tempo de retenção ( $t_R$ ), respectivamente, obtidos com uma solução padrão de fipronil, para confirmar a presença do mesmo nas extrações realizadas.

### 3.5 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE FORMICIDA COMERCIAL:

Cada extrato foi purificado, passando-os por uma coluna de vidro (1,8x21,0 cm), com um pequeno pedaço de algodão na ponta, contendo 10g de sílica 28-200 mesh empacotada em hexano.

Os extratos secos foram totalmente ressolubilizados em 2 mL de uma mistura de hexano e acetato de etila 5:1, também utilizado como eluente, e transferidos quantitativamente para a coluna. A purificação foi acompanhada constantemente por CCF, eluindo-se até que o fipronil não fosse mais observado na revelação das placas comparativas. As frações obtidas foram analisadas separadamente por CG-EM.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO:

Preparou-se uma solução estoque padrão de fipronil a 10,1 g/L, pesando-se 0,0105 g de fipronil com 96% de grau de pureza e o solubilizando em 1 mL de acetato de etila. A partir dessa solução se diluiu sucessivamente, obtendo-se soluções 1,0 g/L, 0,1 g/L, 0,01 g/L,  $1 \times 10^{-3}$  g/L,  $1 \times 10^{-4}$  g/L,  $1 \times 10^{-5}$  g/L,  $1 \times 10^{-6}$  g/L,  $1 \times 10^{-7}$  g/L e  $1 \times 10^{-8}$  g/L. Essas diluições foram feitas medindo 100  $\mu$ L, com uma seringa de 250  $\mu$ L, da solução dez vezes mais concentrada do que a se deseja obter, e se adicionou 900  $\mu$ L de acetato de etila com o pipetador automático. A solução de 1,0 g/L foi preparada se partindo da solução estoque, a de 0,1 g/L a partir da solução recém preparada de 1,0 g/L e assim por diante.

Essas soluções foram injetadas no CG-EM em modo varredura e em modo íon seletivo, observando em cada caso, a menor concentração da solução de fipronil na qual se detectava o seu pico característico, ou seja, quando o pico era, pelo menos, três vezes maior do que o ruído da análise.

As análises de CG-EM em modo íon seletivo monitoraram os fragmentos de 213, 255, 351, 367, 369 e 420 m/z.

A partir da solução estoque a 10,1 g/L, preparou-se soluções 8,0 g/L, 6,0 g/L, 4,0 g/L, 2,0 g/L, 1,0 g/L e 1,0 g/L. Para o preparo dessas soluções, mediu-se com uma seringa de 250 µL os seguintes volumes da solução a 10,1 g/L: 95 µL, 110 µL, 100 µL, 50 µL e novamente 100 µL. Esses volumes foram diluídos com um pipetador automático se adicionando 25 µL, 75 µL, 150 µL, 200 µL e 900 µL de acetato de etila, respectivamente, obtendo-se assim, as soluções na ordem dita anteriormente. Essas soluções foram analisadas por CCF, determinando a menor concentração na qual se observava a mancha característica do fipronil através da revelação por UV ( $\lambda = 254$  nm).

### 3.7 CURVA ANALÍTICA NO CG-EM:

Preparou-se 6 soluções-padrão com concentrações de 2,0 g/L, 1,0 g/L, 0,8 g/L, 0,5 g/L, 0,2 g/L e 0,1 g/L para construção da curva analítica.

Utilizando-se uma seringa de 250 µL e um pipetador automático, fez-se as seguintes diluições com acetato de etila: retirou-se 200 µL de solução estoque a 10,1 g/L e diluiu-se até 1 mL, obtendo-se uma solução 2,0 g/L. A partir dessa solução recém preparada, mediu-se 100 µL e se adicionou 900 µL do solvente, resultando em uma solução a 0,2 g/L. Preparou-se, então, uma solução a 0,1 g/L, retirando-se 100 µL de uma solução padrão 1,0 g/L e a diluindo com 900 µL. Dessa mesma maneira se preparou uma solução 0,8 g/L a partir da padrão a 8,0 g/L. Por fim, mediu-se 100 µL da solução a 4,0 g/L, a diluindo com 700 µL de acetato de etila, obtendo uma solução com concentração final de 0,5 g/L.

Injetou-se essas soluções no CG-EM, na programação de temperatura já estabelecida, obtendo-se a intensidade do pico de fipronil em cada concentração e assim construindo a curva analítica.

### 3.8 FORTIFICAÇÃO DO LEITE:

Pesou-se 10,1 mg de fipronil com 99% de pureza e o adicionou-se a 50,0 mL de leite integral UHT comercial, agitou-se magneticamente em uma placa de agitação por 10 minutos para melhor homogeneização. Fez-se esse procedimento em triplicata.

### 3.9 EXTRAÇÃO DO FIPRONIL DO LEITE:

O método de extração do leite foi adaptado de Le Faouder *et al* [11].

Colocou-se 10,00 mL do leite fortificado em um funil de separação, onde se extraiu duas vezes com 30,0 mL de acetato de etila. Juntou-se os extratos e se adicionou sulfato de sódio anidro até que este tivesse absorvido toda a água presente. O extrato foi, então, seco no rotaevaporador.

Solubilizou-se o extrato seco em 1,0 mL de acetonitrila, transferindo-o em seguida para um funil de separação. Adicionou-se em seguida 6,0 mL de hexano e após agitação, as deixou decantar. Recolheu-se a fase da acetonitrila e se reextraiu a fase do hexano com mais 1,0 mL de acetonitrila. Ambas as fases polares foram combinadas e lavadas com 1,0 mL de hexano. Todas as fases apolares foram, então, descartadas e se obteve o extrato seco evaporando a acetonitrila das fases polares.

### 3.11 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DO LEITE:

Para se certificar da completa remoção da gordura proveniente do leite, fez uma extração em fase sólida em uma coluna de vidro de 1,0 cm de diâmetro e 18,0 cm de altura, na qual se colocou 1,0 g de florissil. A fase de florissil foi condicionada com 5,0 mL de metanol. O extrato seco foi solubilizado em 2,0 mL de metanol e adicionado na coluna. Eluiu-se com 30,0 mL de metanol, acompanhando a purificação por CCF. Deixou-se o solvente evaporar, solubilizando o extrato seco com 1,0 mL de acetato de etila e o transferindo para um vial de 2 mL.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Primeiramente, testou-se as condições das técnicas analíticas, analisando-se uma solução padrão de fipronil a 5,6g/L.

Comparou-se diferentes solventes e misturas de solventes para a CCF, visando a determinação da melhor fase móvel para a análise da substância de interesse. No Quadro 1, podemos observar a comparação dos valores de  $R_f$ .

*Quadro 1: Valores de  $R_f$  do fipronil, em diferentes fases móveis, na CCF.*

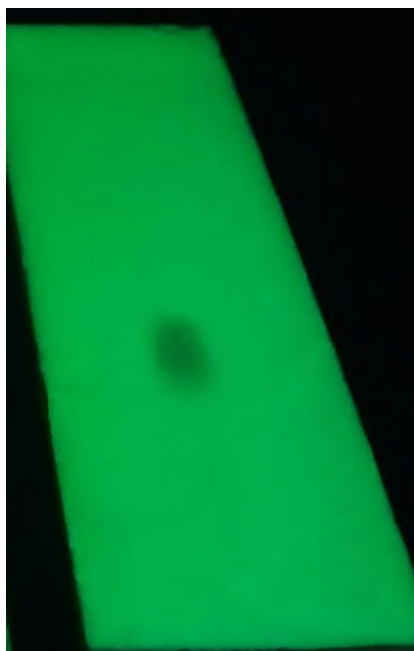
Fase móvel	$R_f$
Clorofórmio/Metanol 1:1	1,0
Acetato de etila	1,0
Hexano	0
Hexano/Acetato de etila 1:1	1,0
Hexano/Acetato de etila 2:1	0,91
Hexano/Acetato de etila 3:1	0,88
Hexano/Acetato de etila 4:1	0,45

Os resultados apresentados no quadro 1, mostram que as fases móveis que eluíram o fipronil junto a frente do solvente ( $R_f = 1,0$ ) ou não o eluíram do ponto de aplicação ( $R_f = 0$ ), não são satisfatórios, pois impedem que se observe a mancha por completo. Esse fato impossibilita a distinção de manchas provenientes de substâncias diferentes, mas que em certa fase móvel é totalmente ou nada eluída, apresentando mesmo  $R_f$ . Portanto, os solventes hexano e acetato de etila e as misturas clorofórmio/metanol 1:1 e hexano/acetato de etila 1:1 são ineficientes nesse caso.

Como se observou que fases móveis predominantemente polares não foram bons eluentes, assim como fases móveis apolares. Testou-se misturas de solventes, em diferentes proporções, para se obter variados graus de polaridade.

As misturas de solventes de hexano/acetato de etila nas proporções 2:1, 3:1 e 4:1 permitiram a observação na mancha em sua totalidade. Apesar das manchas serem visíveis nas corridas dessas misturas nas proporções de 2:1 e 3:1, estas ficam próximas à frente do solvente. Escolheu-se, então a mistura de hexano/acetato de etila 4:1 (Figura 4, pág. 17), porque esta fase móvel elui a substância de interesse até aproximadamente a metade da placa ( $R_f = 0,45$ ), permitindo uma melhor observação, portanto sendo ideal.

Quando se analisou a solução padrão de fipronil 5,6g/L por CG-EM, obteve-se o cromatograma da Figura 5 (pág. 18). Observou-se que, ao contrário do esperado, haviam dois picos relevantes, designados como 1-A ( $t_R = 13,5$  min) e 1-B ( $t_R = 14,4$  min), dos quais os espectros de massas das respectivas substâncias estão ilustrados na Figura 6 (pág. 18) e 7 (pág. 19), respectivamente.



*Figura 4: Análise de uma solução padrão de fipronil a 5,6g/L por CCF em sílica gel, com a mistura hexano/acetato de etila 4:1 como fase móvel.*

O pico mais intenso, 1-A ( $t_R = 13,5$  min), foi identificado como o fipronil ao se comparar seu espectro de massas (Figura 6, pág. 18) com a da literatura (Figura 1 do Anexo 1) obtido na *Spectral Database of Organic Compounds*. O fipronil é, visivelmente, mais abundante que a substância do pico 1-B ( $t_R = 14,4$  min). Os cálculos de integração apontaram uma pureza de aproximadamente 96%, sendo menor que a pureza indicada no rótulo de 99,3%. Outra informação importante obtida a partir deste resultado foi o tempo de retenção do fipronil nestas condições de análise, de aproximadamente 13,5 minutos. Como o tempo de retenção de uma substância não varia substancialmente nas mesmas condições de análises e em uma mesma coluna, essa informação permite a comparação deste pico com outros que se suspeite serem do mesmo composto, para confirmação da presença ou não do fipronil.

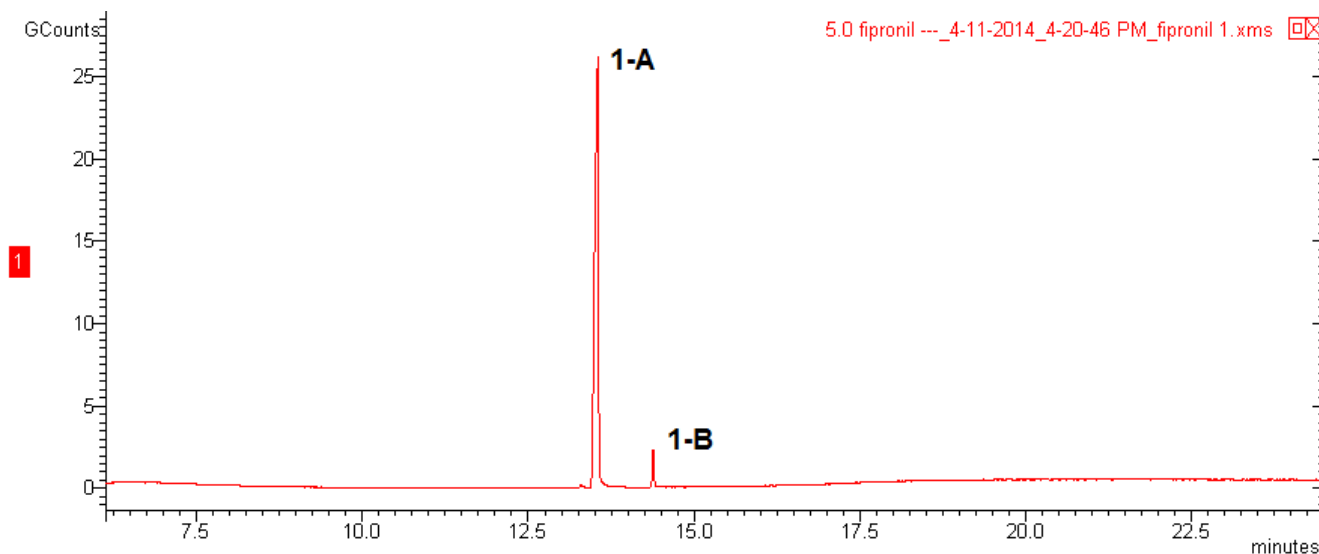


Figura 5: Cromatograma de íons totais da solução padrão de fipronil a 5,6 g/L.

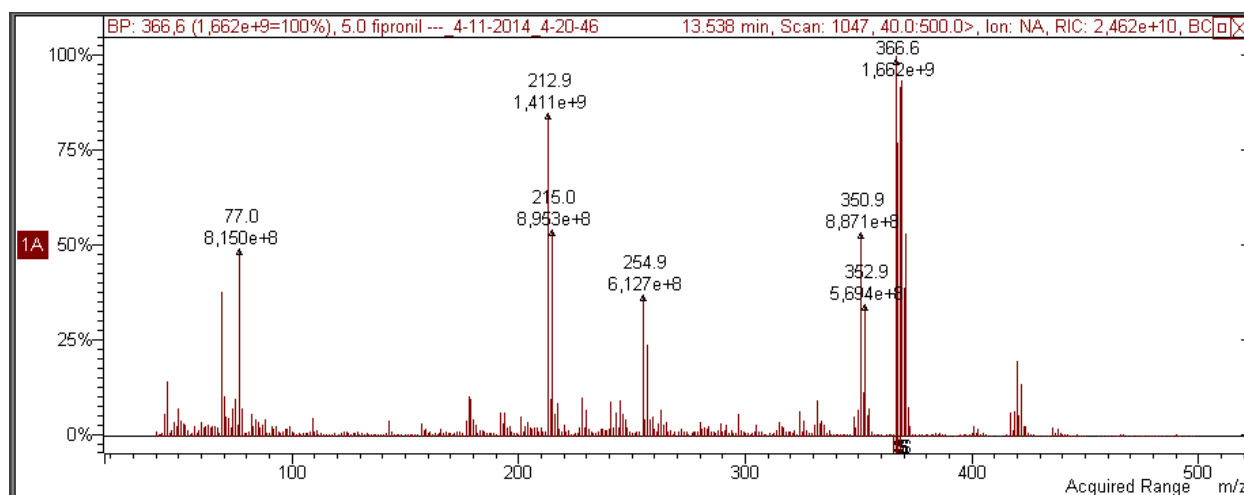


Figura 6: Espectro de massas do pico 1-A com  $t_R=13,5$  minutos.

Devido à improbabilidade do pico 1-B ( $t_R = 14,4$ min) ser referente a uma impureza qualquer, visto que esta era uma solução padrão e se sabia que a impureza não era proveniente do acetato de etila, pois este foi analisado nessas mesmas condições. O seu espectro de massas foi, então, comparado com os dos principais produtos de degradação do fipronil (Figuras 2, 3, 4 e 5 do Anexo 1). O espectro (Figura 7) foi identificado como sendo o da fipronil sulfona quando comparado com os da literatura (Figura 2 do Anexo 1), proveniente da reação de oxidação do fipronil.

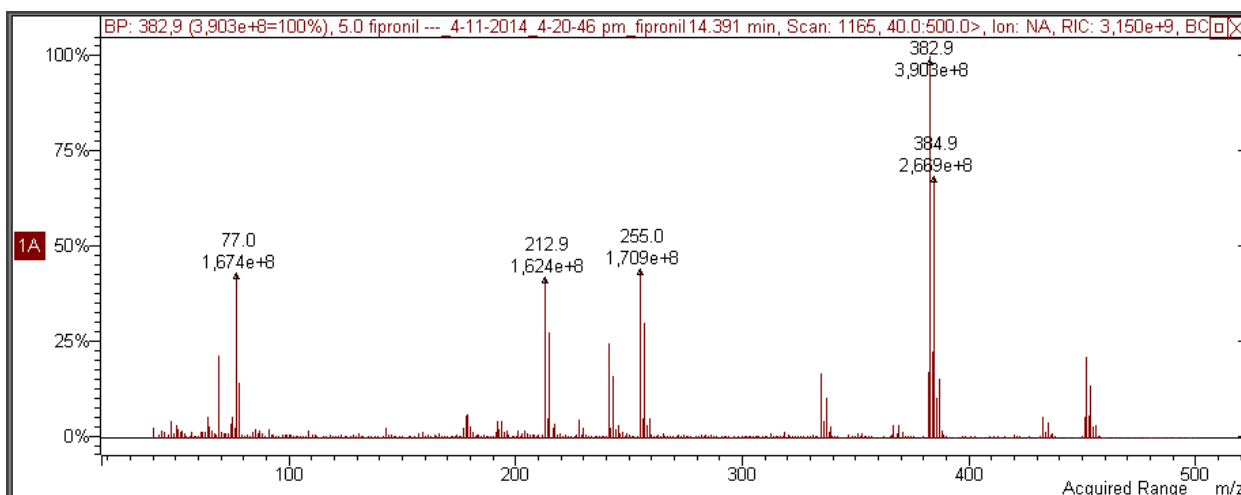


Figura 7: Espectro de massas do pico 1-B com  $t_R=14,4$  minutos.

Com essas informações sobre o comportamento do fipronil nas condições de análise utilizadas, pode-se então, confirmar a presença ou não do fipronil nos extratos provenientes do formicida e da matriz leite.

Devido a pouca quantidade de fipronil padrão disponível, fez-se diversas extrações de um formicida comercial (Figura 8), visando obtenção desta substância em um nível de pureza alto. Podendo-se, então, usar esse fipronil obtido em diversas análises, impedindo que a substância padrão fosse utilizada em sua totalidade ou até faltasse para a continuidade do trabalho.



Figura 8: Formicida comercial contendo 2% de fipronil. À esquerda se observa o produto não triturado e à direita, este parcialmente triturado sendo preparado para a extração.



Para se determinar o melhor solvente de extração do formicida, comparou-se a capacidade de extração do diclorometano, acetato de etila, hexano e acetona, obtendo-se os valores do Quadro 2.

Escolheu-se os solventes diclorometano, acetato de etila e acetona devido a sua probabilidade e por se saber da solubilidade do fipronil nestes, sendo potencialmente eficientes para extração destes. O hexano, apesar de ser apolar, e o fipronil não ser muito solúvel neste, foi testado devido a sua baixa afinidade com a água, podendo ser útil em etapas futuras deste trabalho.

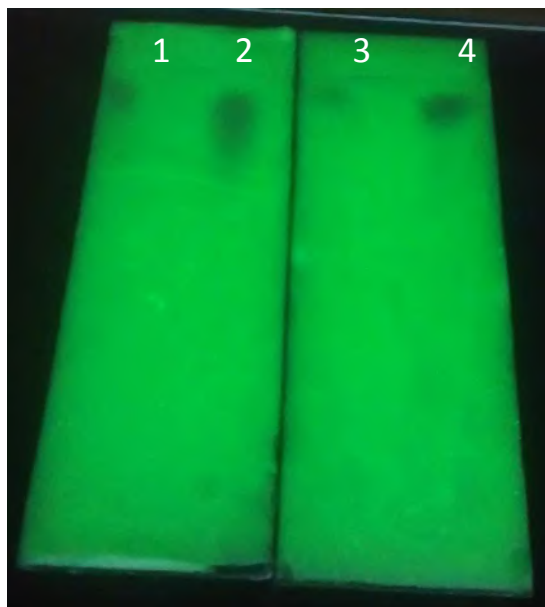
A massa teórica de fipronil em 2g de formicida comercial contendo 2% dessa substância ativa é 0,04g. Observa-se, então, que os solventes que extraíram uma maior massa foram a acetona e o acetato de etila, esse último se pode visualizar na figura 9 (pág. 21), o balão contendo seu extrato seco. O diclorometano e o hexano extraíram uma massa não satisfatória de produto, sendo consideravelmente menor que a quantidade de fipronil no formicida, além disso essa massa extraída contém, possivelmente, outras substâncias presentes no formicida. Esse poder de extração pode ser comparado também ao se analisar esses extratos por CCF, que é uma técnica semi-quantitativa, quando não combinada a um detector quantitativo. Na figura 10 (pág. 21), observa-se a análise por CCF dos quatro extratos provenientes de cada solvente. As manchas 1 e 3 são referentes aos extratos em diclorometano e hexano, respectivamente, apresentando manchas de menor intensidade que os 2 e 4, referentes aos extratos em acetato de etila e acetona, claramente mais concentrados.

*Quadro 2: Comparação de quatro solventes na extração de fipronil do formicida comercial.*

Solvente	Massa de formicida (g)	Massa de fipronil teórica (g)	Massa extraída (g)
Diclorometano	2,0088	0,0401	0,0158
Acetato de etila	2,0031	0,0401	0,0395
Hexano	2,0118	0,0402	0,0058
Acetona	2,0083	0,0402	0,0464



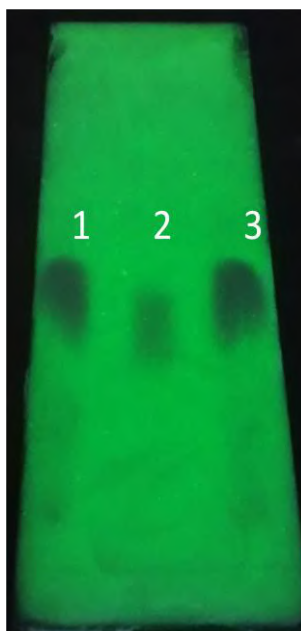
*Figura 9: Balão de fundo redondo contendo extrato seco do formicida comercial em acetato de etila.*



*Figura 10: Placa comparativa das extrações do formicida comercial em quatro solventes diferentes: (1) diclorometano, (2) acetato de etila, (3) hexano e (4) acetona, utilizando-se hexano e acetato de etila 2:1 como fase móvel ( $R_f=0,91$ ).*

Baseando-se nos resultados apresentados no quadro 2 (pág. 19) e na figura 10, sugeriu-se que tanto o diclorometano quanto o hexano, não foram bons solventes para a extração do fipronil a partir do formicida. O acetato de etila e a acetona extraíram uma massa semelhante e apresentaram manchas intensas na CCF, demonstrando que são bons solventes de extração.

Para confirmar que estes solventes estavam de fato extraindo a substância de interesse, fez uma placa comparativa de ambos os extratos e uma solução padrão de fipronil a 5,6g/L (Figura 11). Observou-se que as manchas 1 e 3 provenientes das soluções extraídas do formicida comercial apresentam um  $R_f$  próximo ao da mancha 2 de fipronil padrão. Essa diferença pode ter ocorrido pela alta concentração dos extratos, que faz com que as substâncias eluam um pouco mais, porém, não se descarta que estas sejam provenientes, de fato, do fipronil. A presença de outras manchas é um indicativo que se extraíram outras substâncias além do fipronil. Esse indicativo sugere a necessidade de uma purificação dos extratos, visando aperfeiçoar o método de extração e isolamento.



*Figura 11: Placa comparativa de extratos de formicida comercial em (1) acetona e em (3) acetato de etila com (2) uma solução padrão de fipronil a 5,6g/L, utilizando-se hexano/acetato de etila 4:1 como fase móvel.*

Simultaneamente à análise por CCF, usou-se a CG-EM para confirmar a presença do fipronil e verificar o grau de pureza dos extratos, identificando quando possível as impurezas.

Analisou-se a solução do extrato em acetato de etila (Figura 12, pág. 23) e a do extrato em acetona (Figura 13, pág. 23), verificando-se um comportamento semelhante, com picos de mesmo tempo de retenção e intensidades parecidas. Em ambos cromatogramas há um pico em  $t_R=13,5$  minutos, que indica a presença do fipronil nos extratos, confirmados também pelo espectro de massas. O observado corroborou com os resultados da CCF, de que haviam outras substâncias sendo extraídas além do fipronil. Como se analisou os solventes utilizados, essas

impurezas eram provenientes da extração, portanto, houve necessidade de uma purificação do extrato, visando a otimização do método para obtenção de uma solução de fipronil com pureza elevada a partir do formicida.

A partir destes resultados, pôde-se também obter a porcentagem de fipronil em cada extrato, sendo no extrato em acetato de etila de 58% e em acetona de 51%. O acetato de etila é, portanto, um solvente mais seletivo para essa extração, resultando em uma solução com uma proporção menor de impurezas.

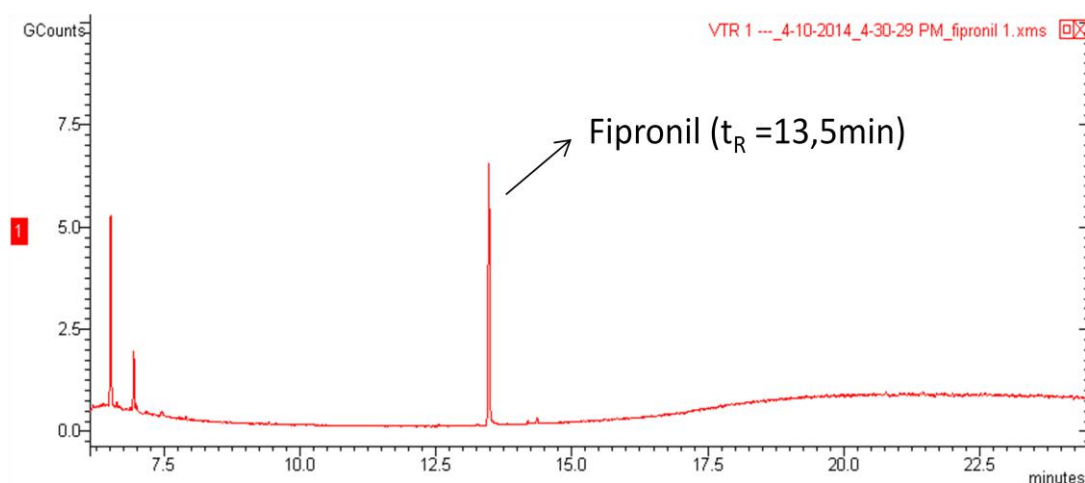


Figura 12: Cromatograma de íons totais da solução extraída do formicida em acetato de etila

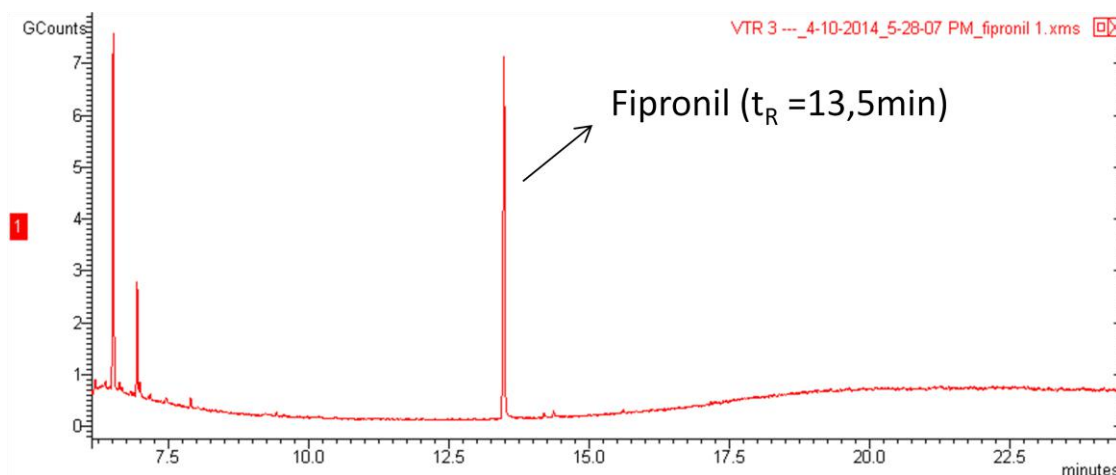


Figura 13: Cromatograma de íons totais da solução extraída do formicida em acetona

Purificou-se o extrato obtido pela extração do formicida comercial em acetato de etila através de uma filtração em coluna de sílica. Obtiveram-se três frações, de aproximadamente 8 mL, que foram analisadas para se avaliar se o método de purificação foi eficiente. Observa-se a

primeira fração obtida neste método (Figura 14), onde claramente se nota a ausência dos picos com tempo de retenção menor que 7 minutos, antes presentes no extrato. O fipronil continua presente, como desejado, agora numa pureza de 98%. Porém ainda há uma pequena fração de fipronil sulfona,  $t_R=14,4$  minutos, que não foi retirada na purificação.

A segunda e a terceira fração obtidas na purificação (Figura 15 e 16, respectivamente), são bem semelhantes à primeira, conseguindo também um grau de pureza elevado de 98%.

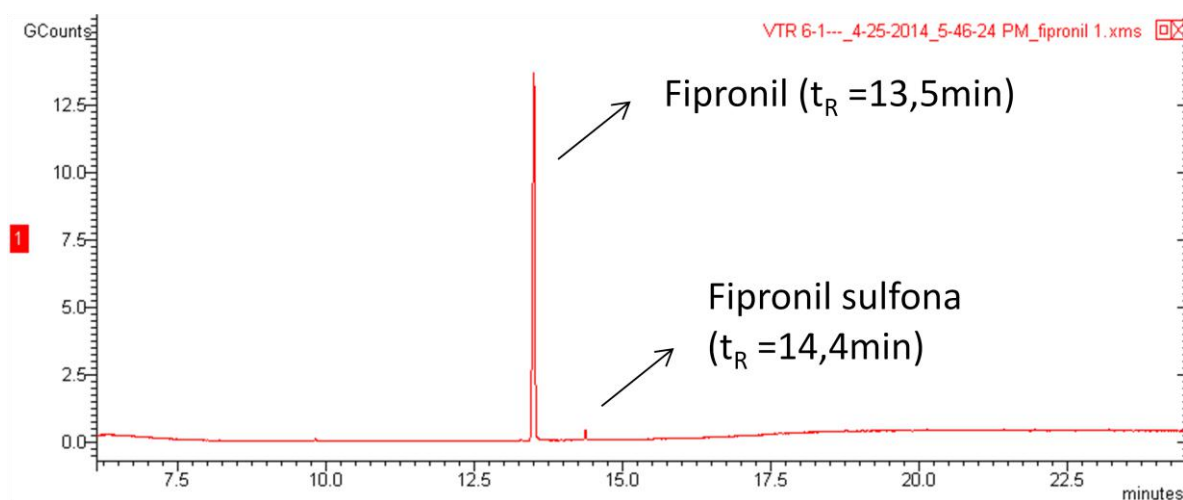


Figura 14: Cromatograma de íons totais da primeira fração obtida na purificação do extrato em acetato de etila

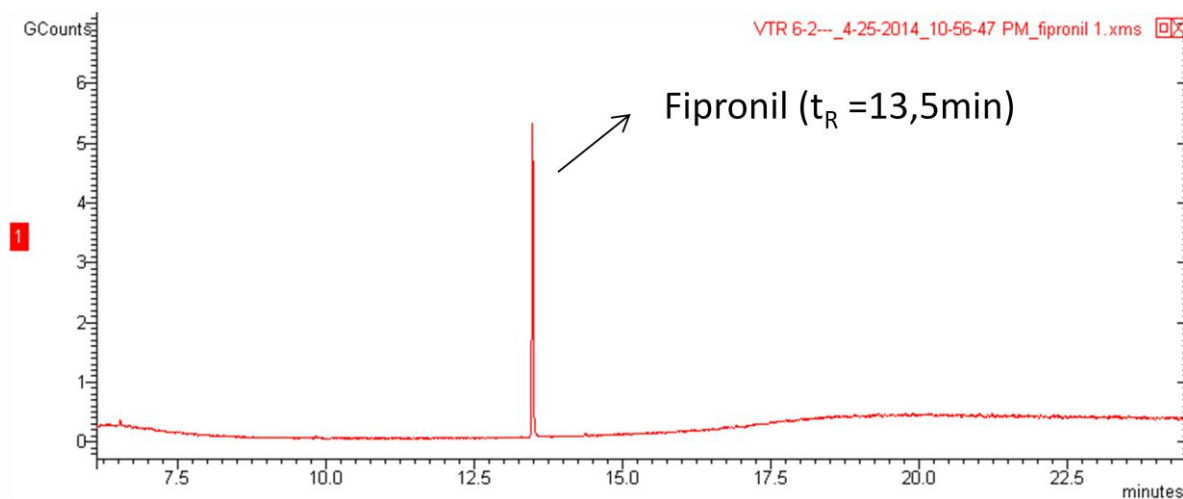


Figura 15: Cromatograma de íons totais da segunda fração obtida na purificação do extrato em acetato de etila

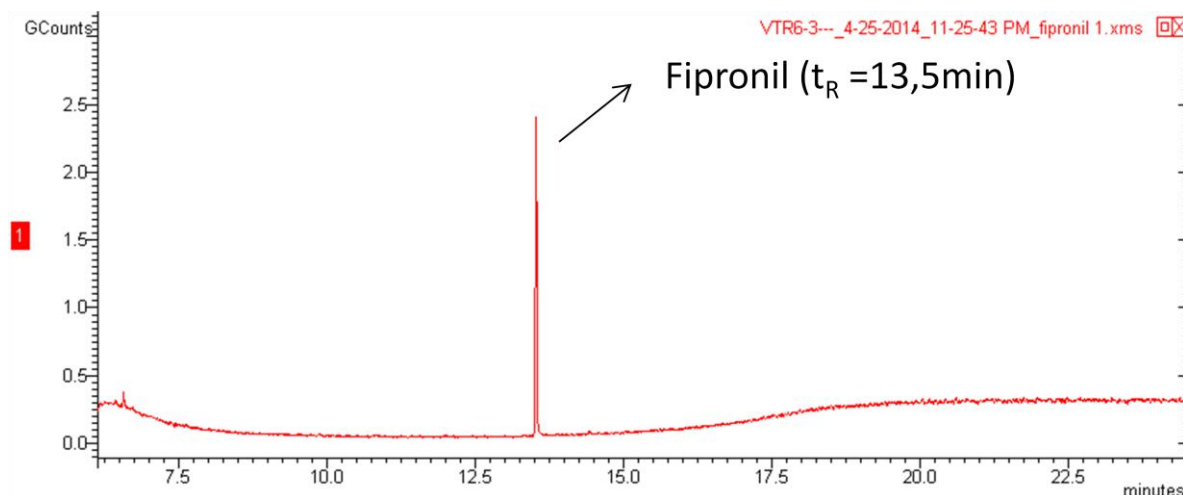


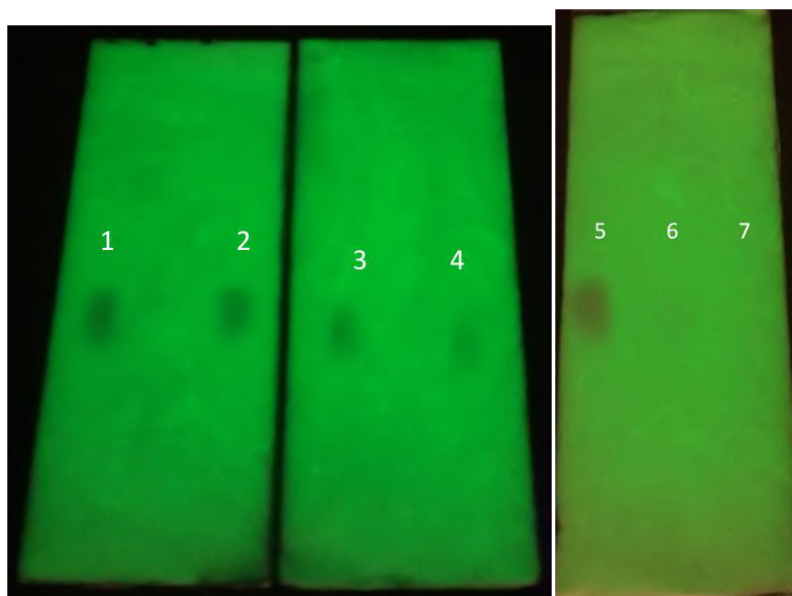
Figura 16: Cromatograma de íons totais da terceira fração obtida na purificação do extrato em acetato de etila

Repetiu-se esse procedimento de extração e purificação diversas vezes, para se adquirir uma maior quantidade de fipronil, obtendo-o em purezas de até 99%.

Quando se obteve quantidade suficiente de fipronil, preparou-se soluções-padrão em diversas concentrações a fim de determinar o LD do fipronil em CCF e em CG-EM, tanto em modo varredura, como em modo de íon seletivo.

O limite de detecção é definido pela Resolução RE n° 899 da Anvisa de 29 de Maio de 2003 como a menor quantidade da substância de interesse que pode ser detectada pela técnica analítica utilizada. Em CCF, este limite seria a menor quantidade em que se observaria a mancha dessa substância. Já nas técnicas que possuem linha de base, como o CG-EM, o LD é a menor concentração em que o pico da substância de interesse é, no mínimo, três vezes maior que o ruído da linha de base.

Para se determinar o LD do fipronil em CCF nessas condições de análise, fez-se diversas placas comparativas, aplicando-se 2 µL de soluções padrão do fipronil em diferentes concentrações. Na figura 14, observamos três placas comparativas com soluções padrão de 10,0; 8,0; 6,0; 4,0; 2,0; 1,0 e 0,1 g/L. As manchas 1, 2 e 3 são claramente visíveis, porém a 4 já é pouco intensa, mais difícil de se observar. Testou-se, por fim, uma solução a 1,0g/L (mancha 6 na figura 17, pág. 26) e nenhuma mancha foi observada. Portanto, a menor concentração em que uma mancha de fipronil é observável por CCF está entre 1,0 e 2,0 g/L, sendo o LD considerado como 2,0 g/L para este trabalho.



*Figura 17: Determinação do LD do fipronil em CCF em sílica gel, adicionando-se soluções padrão de concentrações (1) 8,0g/L, (2) 6,0g/L, (3) 4,0g/L e (4) 2,0g/L, (5) 10,1g/L, (6) 1,0g/L e (7) 0,1g/L utilizando-se hexano/acetato de etila 4:1 como fase móvel e 2 $\mu$ L de amostra em cada spot.*

Por CG-EM, determinou-se o LD em ambos cromatógrafos usados no trabalho. No cromatógrafo Varian se determinou este limite tanto em modo varredura, quanto em modo de íon seletivo, monitorando os fragmentos de 213, 255, 351, 367, 369 e 420 m/z. Já no cromatógrafo Shimadzu, determinou-se apenas em modo varredura.

O limite de quantificação, analogamente ao LD, é definido pela mesma Resolução da Anvisa como sendo a menor quantidade em que uma substância de interesse pode ser determinada com precisão e exatidão. Como a CCF não é uma técnica quantitativa, esse limite não é apropriado para esta. Para a CG-EM e demais técnicas que possuem linha de base, o LQ é a menor concentração em que o pico da substância de interesse é, no mínimo, dez vezes maior que o ruído da linha base.

No cromatógrafo Varian, analisou-se soluções-padrão a 1,0 g/L, 0,1 g/L, 0,01 g/L,  $1 \times 10^{-3}$  g/L,  $1 \times 10^{-4}$  g/L,  $1 \times 10^{-5}$  g/L,  $1 \times 10^{-6}$  g/L,  $1 \times 10^{-7}$  g/L e  $1 \times 10^{-8}$  g/L. Em modo varredura, a menor concentração em que o fipronil foi detectado foi de 0,01 g/L (Figura 18, pág. 27), obtendo-se uma razão sinal ruído igual a 20 (Figura 19, pág. 27), nesse cromatograma é perceptível que há um sangramento da fase estacionária da coluna capilar. A solução a  $1 \times 10^{-3}$  g/L não gerou um pico detectável de fipronil, portanto, nesse caso, o LD coincide com o LQ, sendo igual a 0,01 g/L ou 10 mg/L. Já em modo íon seletivo, a menor concentração em que o pico referente ao fipronil pôde ser observado foi de  $1 \times 10^{-7}$  g/L (Figura 20, pág. 27). O fipronil não foi detectado na análise da solução-padrão a  $1 \times 10^{-8}$  g/L, portanto tanto o LD quanto o LQ desta substância no CG-EM

em modo íon seletivo está entre esses dois valores, sendo considerado igual a  $0,1\mu\text{g/L}$ , obtendo-se um pico com razão sinal ruído de 23 (Figura 21, pág. 28).

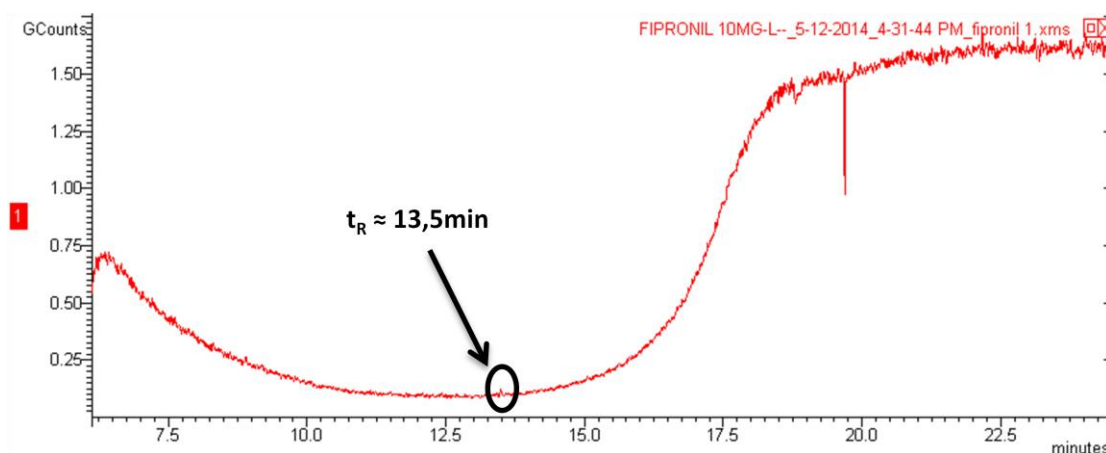


Figura 18: Cromatograma de íons totais em modo varredura no cromatógrafo Varian de uma solução-padrão de fipronil ( $t_R = 13,5\text{min}$ ) a  $10,0\text{mg/L}$  para determinação dos LD e LQ.

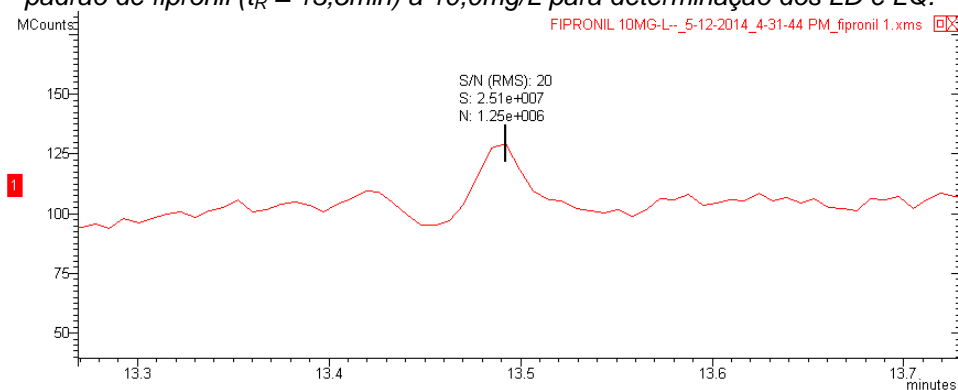


Figura 19: Ampliação do pico referente ao fipronil com um  $t_R = 13,5\text{min}$  da Figura 15, na determinação dos LD e LQ no cromatógrafo Varian em modo varredura.

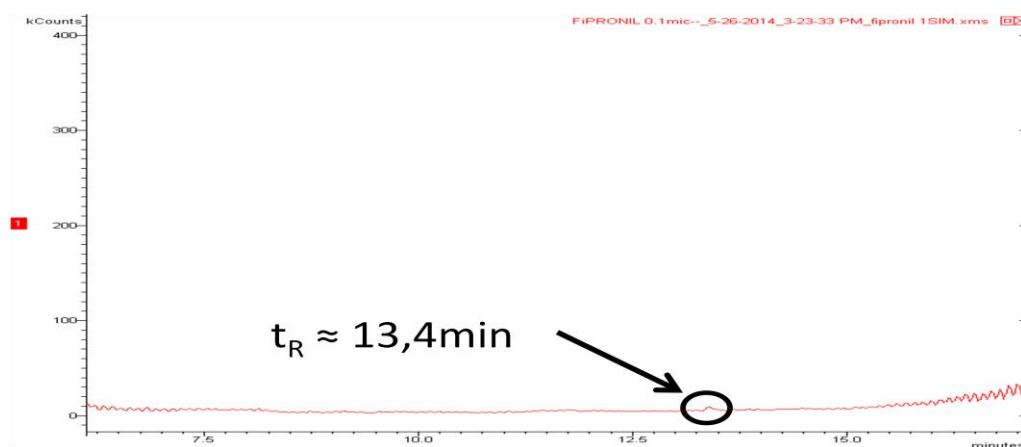


Figura 20: Cromatograma de íons totais em modo de íon seletivo no cromatógrafo Varian de uma solução-padrão de fipronil ( $t_R = 13,4\text{min}$ ) a  $0,1\mu\text{g/L}$  para determinação dos LD e LQ.



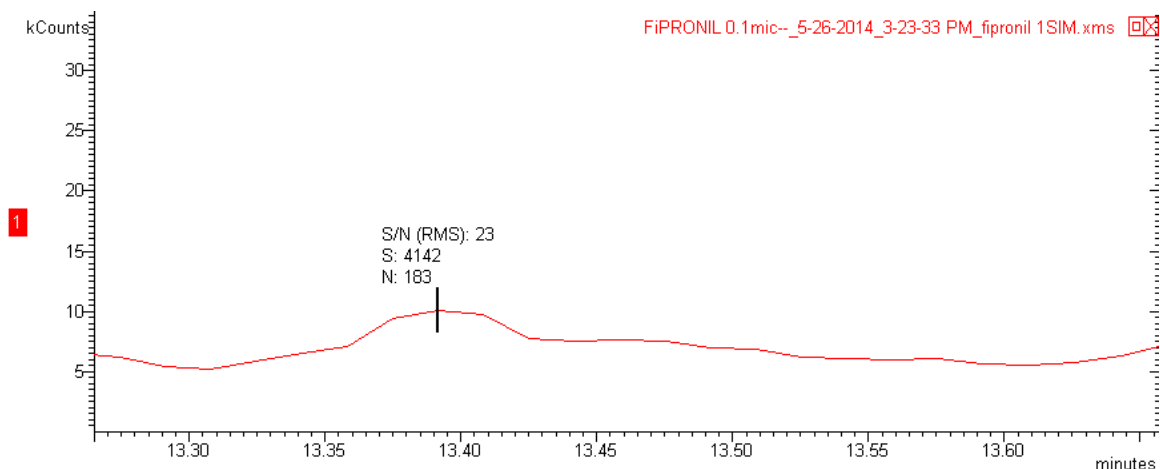


Figura 21: Ampliação do pico referente ao fipronil com um  $t_R = 13,4\text{min}$  da Figura 17, na determinação dos LD e LQ no cromatógrafo Varian em modo íon seletivo.

Devido a um problema no cromatógrafo usado no trabalho até então, teve-se que utilizar outro também acoplado a um Espectrômetro de Massas, portanto se deve determinar o LD e o LQ para este equipamento, feito apenas em modo de varredura. Analisou-se soluções-padrão de fipronil a 1,0 g/L, 0,1 g/L, 0,01 g/L e  $1 \times 10^{-3}$  g/L. A menor concentração em que a substância de interesse foi detectada foi de 0,01 g/L (Figura 22). Como o pico referente ao fipronil não foi observado na solução a  $1 \times 10^{-3}$  g/L, novamente os LD e LQ estão entre esses valores, sendo considerados iguais a 10,0 mg/L.

O fato de o LD ser igual para ambos cromatógrafos, tendo eles o mesmo detector e se usando a mesma fase estacionária, demonstra que essa técnica é robusta.

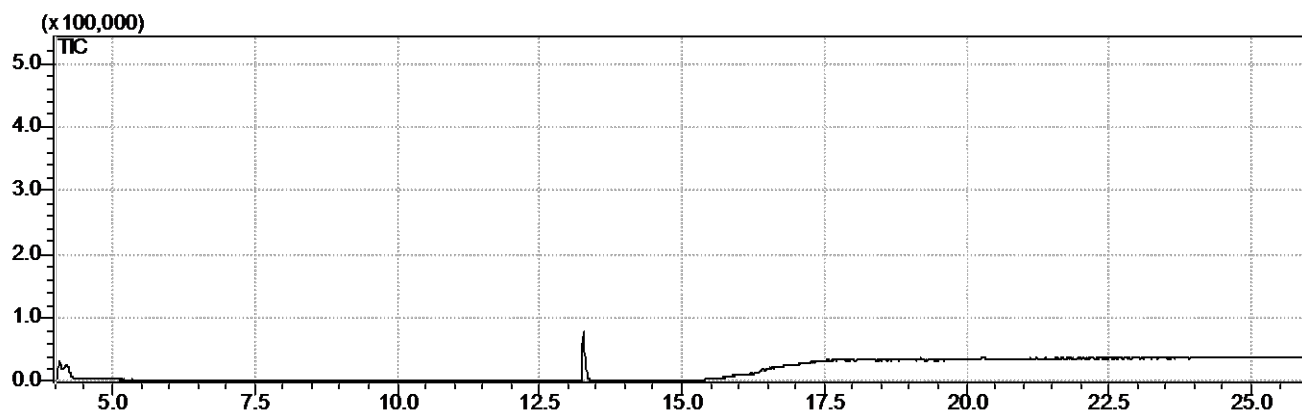


Figura 22: Cromatograma de íons totais em modo varredura no cromatógrafo Shimadzu de uma solução-padrão de fipronil ( $t_R = 13,25\text{ min}$ ) a 10,0 mg/L para determinação dos LD e LQ.

Mesmo se considerando que a coluna utilizada nas análises do cromatógrafo Shimadzu contém a mesma fase estacionária que o equipamento utilizado anteriormente, pequenas diferenças no tempo de retenção do fipronil pode ocorrer. Para comprovar que o pico em 13,25

minutos é de fato a substância de interesse, observa-se seu espectro de massas (Figura 23), comparando-o com o da literatura (Figura 1 do Anexo 1), confirma-se que este é de fato referente ao fipronil.

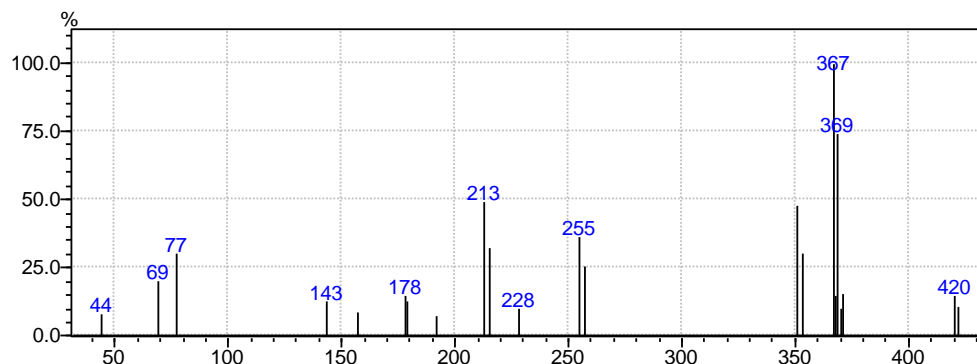


Figura 23: Espectro de massas referente ao pico de  $t_R = 13,25$  min da Figura 19.

Conhecendo-se os LD e LQ do fipronil na metodologia analítica, construiu-se uma curva analítica utilizando soluções-padrão de 2,0; 1,0; 0,8; 0,5; 0,2 e 0,1 g/L. Todos os pontos foram analisados em triplicata. Essa curva analítica permite que se determine o grau de recuperação do fipronil na extração da matriz leite.

Os valores de área do pico do fipronil obtidos para cada concentração foram plotados *versus* as concentrações das solução-padrão no Gráfico 1.

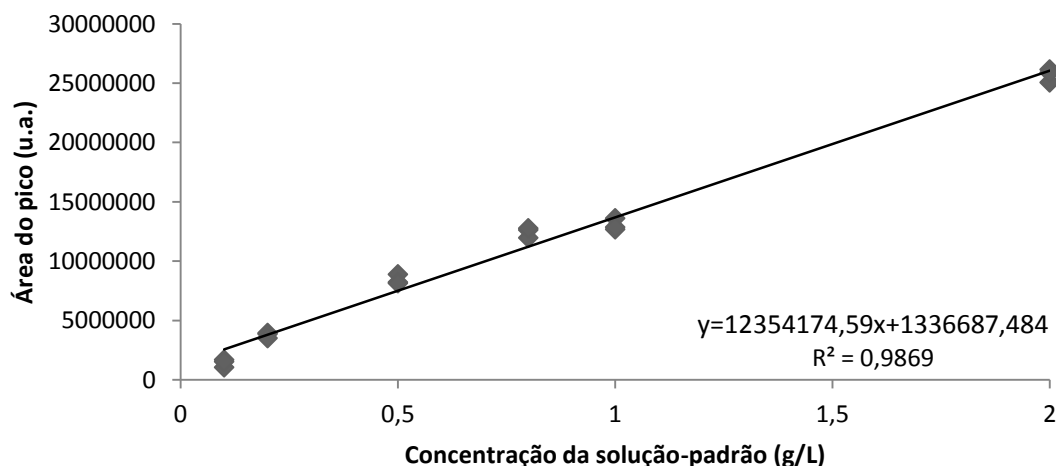


Gráfico 1: Curva analítica de análise de fipronil por CG-EM no cromatógrafo Shimadzu.

Como a curva foi representada por uma reta, esta pode ser representada pela equação  $y=ax+b$ . Com os dados obtidos, determinou-se os coeficientes dessa equação, com seus respectivos intervalos de confiança (IC), calculados pela equação abaixo:

$$IC = \frac{t \times s}{\sqrt{n}}$$

Na qual,  $t$  é o  $t$  de Student,  $s$  é o desvio padrão e  $n$  é o número de experimentos realizados. O valor obtido do coeficiente angular foi de 12.354.174,59, com um IC de 961.621,712 e do coeficiente linear foi de 1.336.687,484 com um IC de 956.735,0365.

Para se comprovar que esta curva tem sua variável dependente e independente correlacionadas, fez-se um teste-F (Quadro 3), em que se levantou duas hipóteses:

$$H_0: a_1 = 0$$

$$H_1: a_1 \neq 0$$

onde  $a$  é o coeficiente angular calculado pela regressão. Para tal, o valor de  $F$  calculado para o teste é dado pela equação abaixo:

$$F_{calc} = \frac{MQR}{MQE}$$

Quadro 3: Análise estatística por ANOVA dos dados da curva analítica.

ANOVA				
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{calc}$
Regressão	1,10501E+15	1	1,10501E+15	1203,2894
Erro ou Resíduo	1,46932E+13	16	9,18324E+11	
Total	1,1197E+15	17		

Nesse caso,  $MQR$  é a média quadrática da regressão e  $MQE$  é a média quadrática do erro. Para que a hipótese  $H_0$  seja válida, este valor de  $F_{calc}$  deve ser menor que o  $F_{crit}$  do experimento, que é igual a 4,49 (Anexo 2). Portanto, como  $F_{calc} > F_{crit}$ , a hipótese  $H_1$  é verdadeira, concluindo-se que há correlação entre as variáveis dependente e independente.

Com todos esses dados sobre o comportamento do fipronil nas técnicas utilizadas, começou-se as extrações na matriz leite.

Ao se fazer a primeira extração do leite fortificado com acetato de etila, observou-se que as proteínas do leite foram desnaturadas. Isso dificultou o recolhimento da fase desejada durante a segunda extração com o mesmo solvente e impossibilitou que uma terceira extração fosse feita para aumentar a eficiência do método.

Retirou-se a água presente na combinação dos extratos com sulfato de sódio anidro, obtendo em seguida o extrato seco por rotaevaporação. Para retirada das gorduras do leite, fez-se extrações líquido-líquido com acetonitrila e hexano, nas quais se recolhia a fase polar.

Para garantir que este extrato estava livre das gorduras provenientes do leite, fez-se ainda uma purificação por extração em fase sólida em coluna de florisil. A fração recolhida desta extração foi, então, analisada por CG-EM. Todas as extrações, assim como as análises em branco, foram feitas em triplicata.

O leite, 50,0mL, foi fortificado com 10,1mg de fipronil 99%. Em 10,0 mL deste leite, terá, portanto, 2,0 mg da substância de interesse.

Primeiramente, analisou-se a solução em branco do extrato de leite não-fortificado, para se observar se alguma substância presente nesse extrato iria eluir no mesmo tempo de retenção do fipronil ( $t_R = 13,25$  min). Pode-se observar que não houve picos nesse tempo de retenção no cromatograma (Figura 24), porém há uma substância que eluiu em  $t_R=13,35$  min. O espectro de massas dessa substância (Figura 25) comprova, no entanto, que esta não se trata do fipronil.

Sabendo-se que impurezas do extrato não coeluem com o fipronil, pode-se analisar os extratos do leite fortificado.

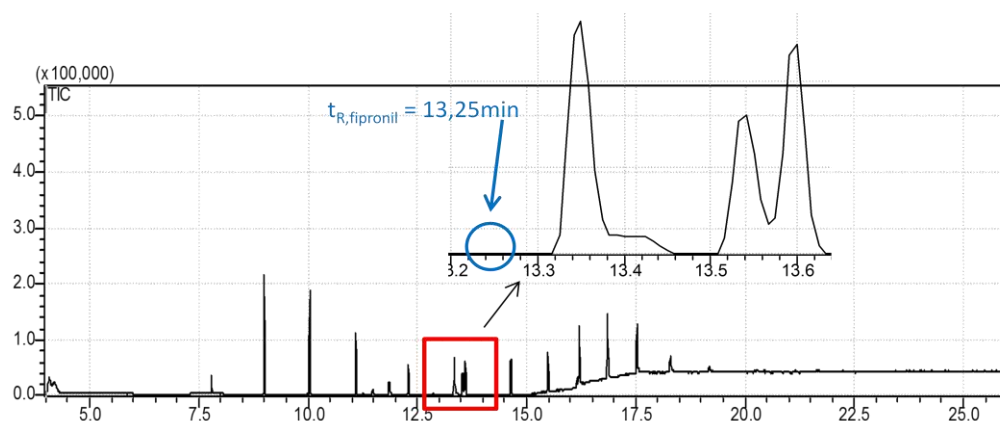


Figura 24: Cromatograma de íons totais da análise branco do extrato de leite.

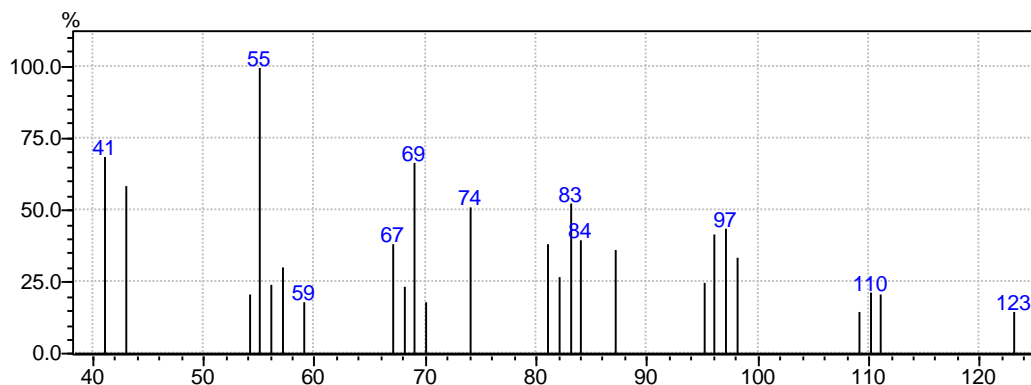


Figura 25: Espectro de massas do pico em  $t_R=13,35$  min da análise branco do extrato do leite.

A primeira triplicata, L1, foi analisada (Figura 26) e se observou o pico referente ao fipronil com  $t_R=13,3$  min, confirmando a presença deste nos extratos. Em 14,3min, observa-se um pico de menor intensidade, que foi identificado como a fipronil sulfona, substância proveniente da oxidação do fipronil.

Este comportamento foi observado também nas replicatas L2 e L3, como pode ser observado nas figuras 27 (pág. 33) e 28 (pág. 34).

É perceptível que a intensidade do sinal referente ao pico do fipronil varia dentro das triplicatas e entre elas. Esse fato gera uma suspeita de que o método não está gerando resultados de boa reprodutibilidade, ou seja, há uma grande quantidade de erros associados a este.

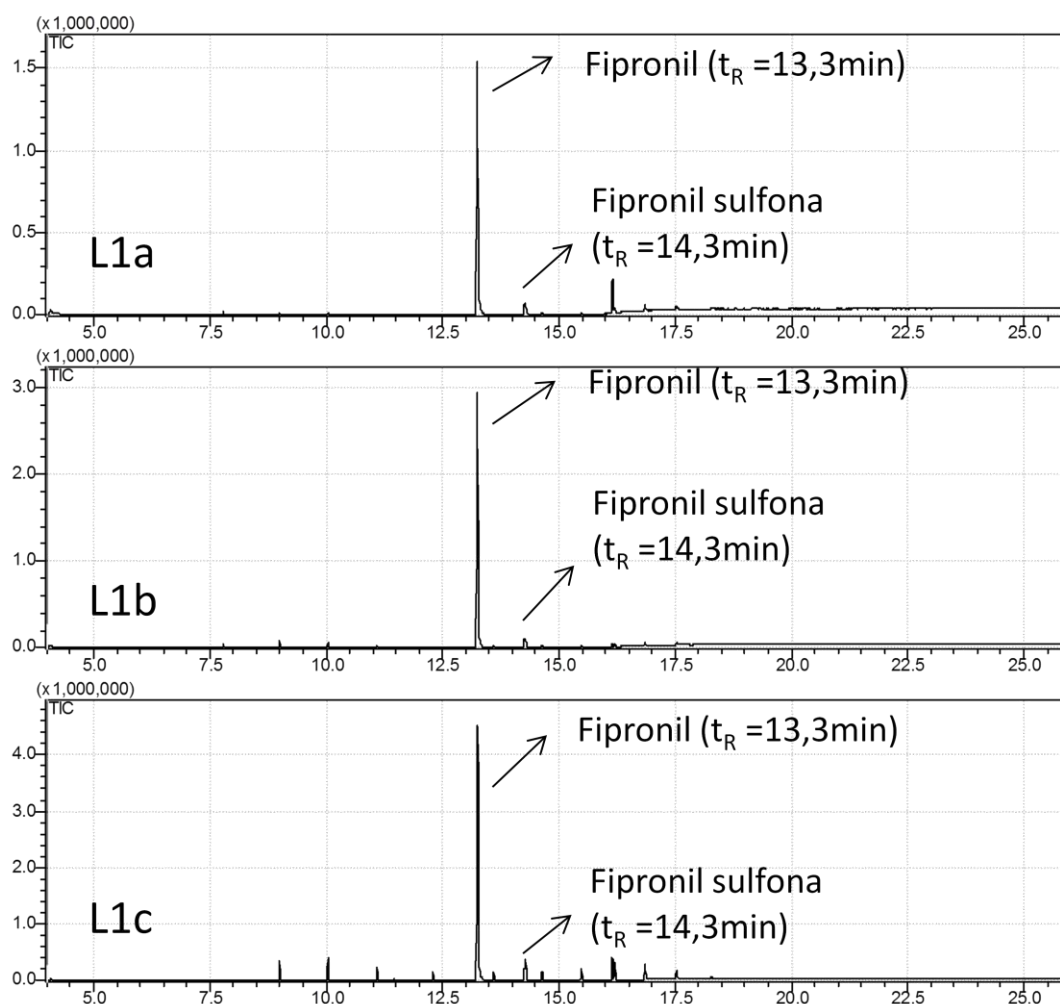


Figura 26: Cromatogramas de íons totais da triplicata L1 da análise do extrato de fipronil no leite fortificado.

Para se verificar se o método é reprodutível, tratou-se os dados como mostrado na Tabela 4 (pág. 34), predizendo-se a concentração dos extratos do fipronil, relacionando estas com a área do pico pela curva analítica construída anteriormente.

Como esperado pela observação das intensidades dos picos, comprova-se que há uma grande variação dos valores de áreas do pico do fipronil entre as análises. Consequentemente, as concentrações também variam grandemente, com o L1a estando mais de cinco vezes menos concentrado que o L1c.

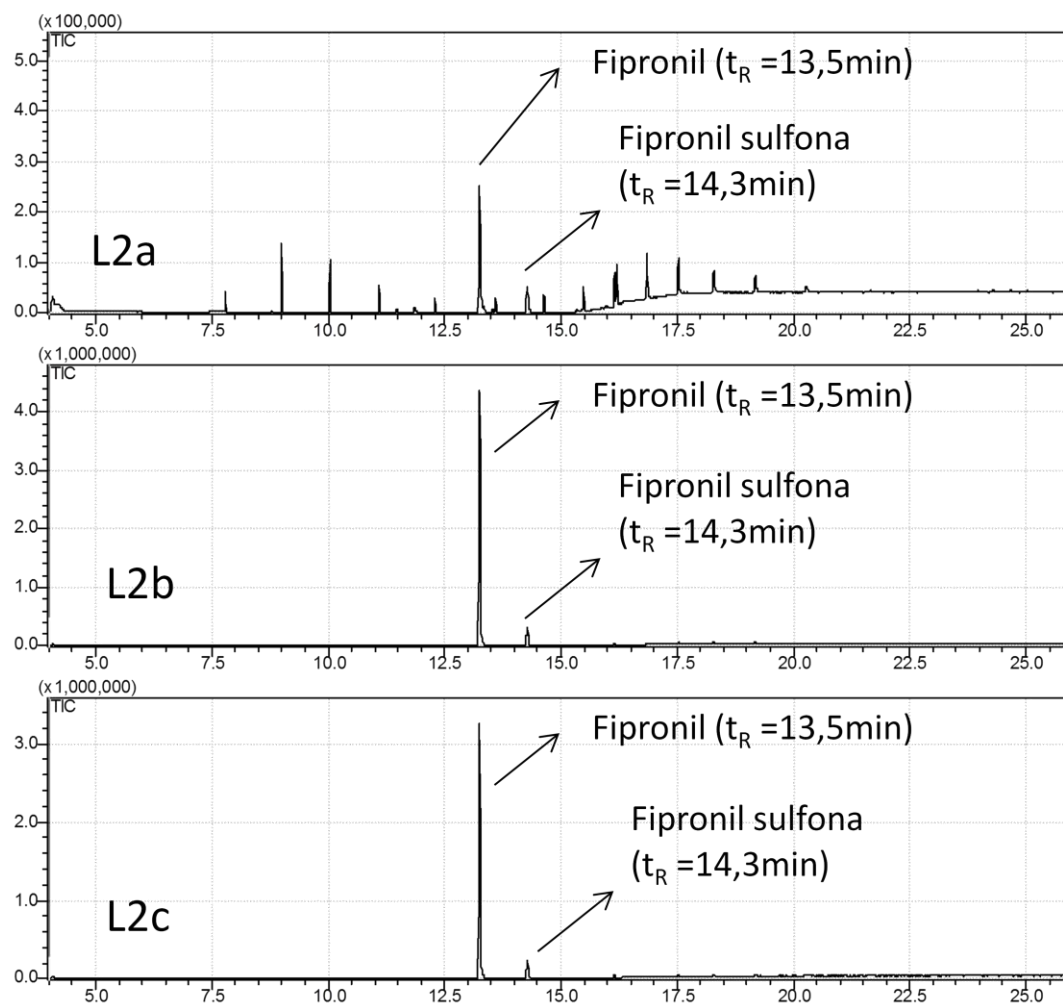


Figura 27: Cromatogramas de íons totais da triplicata L2 da análise do extrato de fipronil no leite fortificado.

Os graus de recuperação do fipronil nas extrações, considerando-se a concentração esperada de 2,0g/L, variaram de 6,45 a 31,70%.

Os valores de áreas das replicatas L2a, L3a e L3b ficaram fora do intervalo da curva analítica, portanto não se pode determinar seus graus de recuperação.

Os erros associados a esse método podem ser provenientes de várias etapas, como a de fortificação, pois o leite é constituído predominantemente de água e a solubilidade do fipronil é baixa, fazendo que uma pequena quantidade da substância de interesse seja solubilizada de fato.

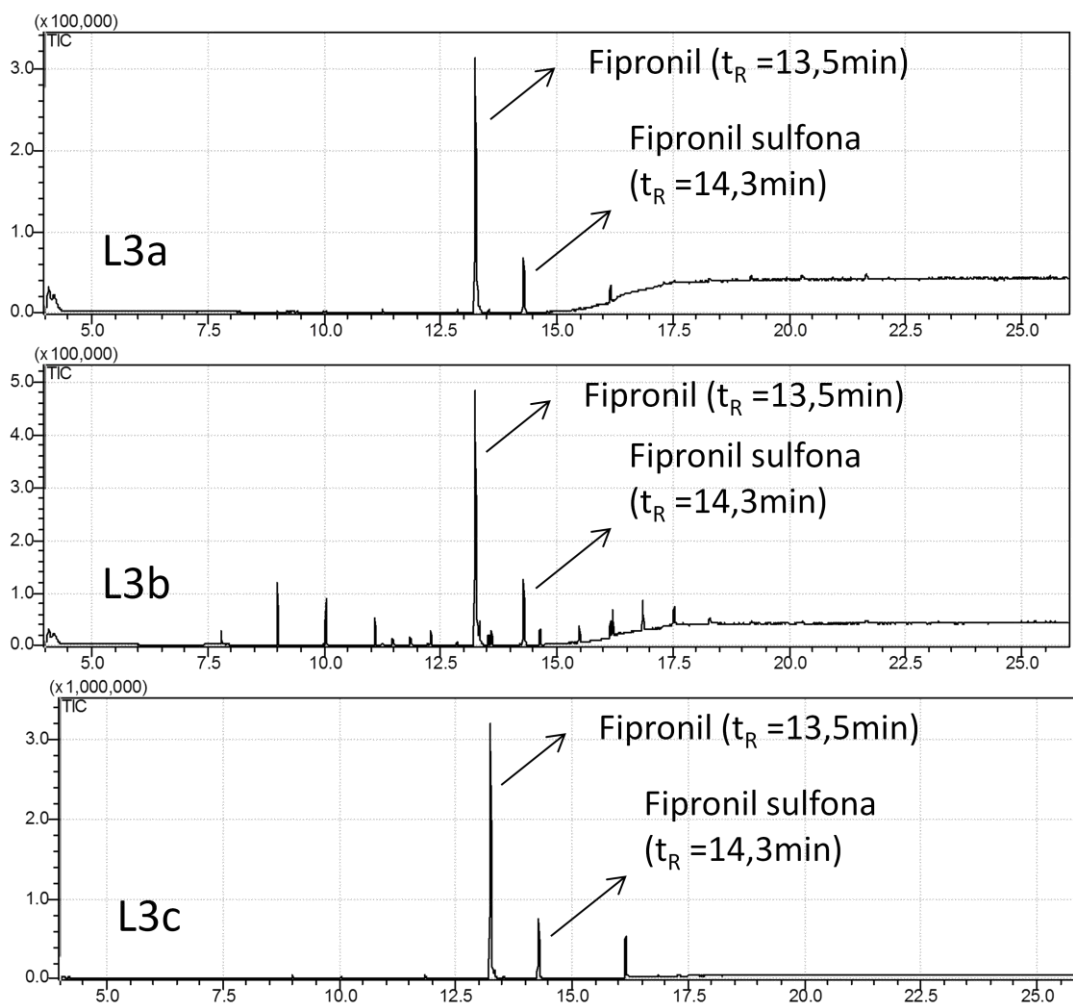


Figura 28: Cromatogramas de íons totais da triplicata L3 da análise do extrato de fipronil no leite fortificado.

A etapa referente à extração do leite com acetato de etila também pode gerar erros não-sistemáticos, pois depende do operador. Como mencionado, o contato do leite com o solvente utilizado faz com que suas proteínas desnaturem, dificultando a recuperação da fase de interesse, e diminuindo o grau de recuperação do fipronil.

*Tabela 4: Dados obtidos da análise dos extratos do leite fortificado pelo método proposto.*

Extrato	Área do pico	Concentração esperada (g/L)	Concentração predita (g/L)	Grau de recuperação (%)
L1a	2925035	2,0	0,129	6,45
L1b	5526880	2,0	0,339	16,95
L1c	9169692	2,0	0,634	31,70
L2a	505276	2,0	---	---
L2b	9160963	2,0	0,633	31,65
L2c	6365169	2,0	0,407	20,35
L3a	651795	2,0	---	---
L3b	957852	2,0	---	---
L3c	6066719	2,0	0,383	19,15
Média	4592153	---	0,421	10,52

Além destes mencionados, podem ocorrer perdas da substância de interesse durante as etapas de remoção de gordura. O fipronil pode ter sido retido na coluna de florisil durante a extração em fase sólida. Os erros referentes a essas etapas, no entanto, são inerentes ao método e podem ser considerados sistemáticos.

É importante se notar, que em todos os extratos da matriz leite, pode-se observar tanto o pico do fipronil como o de seu produto de degradação, a fipronil sulfona. Como o pico desta não foi observado na análise em branco, infere-se que este só pode ser proveniente da fortificação do leite. Em estudos posteriores, pode-se pensar na possibilidade de se usar a soma das áreas desses picos para o cálculo do grau de recuperação.

Apesar do método ter apresentado uma baixa repetibilidade, em todas as replicatas a concentração do fipronil na solução foi maior que o LD do equipamento. Portanto, este método se provou aplicável para a identificação do fipronil na matriz leite, porém, não foi eficiente, apresentando graus de recuperação baixos.

## 5 CONCLUSÃO:

O método de extração e purificação do fipronil a partir do formicida comercial é eficiente, sendo o melhor solvente para este o acetato de etila, pois além de efetivo é o mais seletivo dos



testados para a substância de interesse. O fipronil obtido apresentou alto grau de pureza, de até 99%.

Determinou-se os limites de detecção do fipronil em todas as técnicas analíticas aplicadas: cromatografia em camada fina, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tanto em um cromatógrafo Varian quanto em um Shimadzu. Os valores de LD determinados foram de 2,0g/L em CCF e 10mg/L em ambas CG-EM. Determinou-se também os limites de quantificação no CG-EM, valor que coincidiu com o LD desta técnica.

Conseguiu-se isolar e identificar o fipronil em todas as análises dos extratos do leite fortificado, portanto o método é aplicável, apesar de ter baixa reprodutibilidade e grau de recuperação, portanto, não sendo eficiente. Nas análises em branco do leite comercial, o fipronil não foi detectado.

Apesar de a técnica ter identificado o fipronil em todas as amostras, os graus de recuperação foram baixos, sendo inferiores a 32%. Portanto, melhorias a esta devem ser estudadas, visando diminuir os erros e otimizando a extração.

Melhorias no método poderiam ser obtidas, fazendo-se um estudo do efeito de matriz do leite na extração do fipronil. Mudanças no método poderiam ser feitas, para se melhorar o grau de recuperação. Na etapa de extração do leite fortificado com acetato de etila, por exemplo, poderia se centrifugar as duas fases, para se obter uma melhor separação.

## BIBLIOGRAFIA:

- [1] Briner, R.C. Forensic Chemistry. **J. Chem. Educ.**, 59 (1982) p.41-44.
- [2] Waiselfisz, J.J., Mapa da Violência 2011. **Centro Brasileiro de Estudos Latino-Americanos**.
- [3] Lara, W.H.; Batista, G.C. Pesticidas. **Química Nova**, 15(2) (1992) p.161-166.
- [4] Kadar, A.; Faucon, J.P.J. Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Agric. Food Chem.**, 2006, 54, p.9741-9746.
- [5] Bochner, R. Sistema Nacional de Informações-Farmacológicas – SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, 12(1) (2007), p.73-89.
- [6] **Pesticides News No.48**, June 2000, p20.

- [7] Gant, D.B. *et al.* Fipronil: Action at the GABA receptor. **Reviews in Toxicology** 2 (1998) p.147-156.
- [8] Jackson, D. *et al.* 2009. Fipronil Technical Fact Sheet. **National Pesticide Information Center**, Oregon State University Extension Services.
- [9] Bichon, E.; Richard, C.A.; Le Bizec, B. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasma using 96-well plate solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1201 (2008) p.91-99.
- [10] Ramasubramian, T. *et al.* A simple and sensitive single-step method for gas chromatography-mass spectrometric determination of fipronil and its metabolites in sugarcane juice, jiggery and sugar. **Food Chemistry**, 150 (2014) p.408-413.
- [11] Lacroix, M.Z. *et al.* Quantification of fipronil and its metabolite fipronil sulfone in rat plasma over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. **Journal of Chromatography B**, 878 (2010) p.1934-1938.
- [12] Jimenéz, J.J. *et al.* Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, 1187 (2008) p.40-45.
- [13] Le Faouder, J. *et al.* Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. **Talanta**, 73 (2007) p.710-717.
- [14] Hadjmohammadi, M.R.; Nikou, S.M.; Kamel, K. Determination of Fipronil Residue in Soil and Water in the Rice Fields in North of Iran by RP-HPLC Method. **Acta Chim. Slov.**, 53 (2006) 517–520.